Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Enzymaktivitäten von Thrombozyten verschiedener Dichte bei Thrombozytosen nach Splenektomie und bei chronisch myeloischer Leukämie (CML)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Ursula Margarete Thorau geb. Maier
aus Nagold

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Enzymaktivitäten von Thrombozyten verschiedener Dichte bei Thrombozytosen nach Splenektomie und bei chronisch myeloischer Leukämie (CML)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Ursula Margarete Thorau geb. Maier
aus Nagold

1984

Dekan:	Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Chr. Benöhr
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Ostendorf

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methodik	5
A. Geräte und Reagentien	5
B. Abkürzungen	6
C. Gewinnung, Vorbereitung und Zählung der Thrombozyten	7
D. Dichtegradientenzentrifugation	7
E. Herstellung des Thrombozytencytolysats	1o
F. Enzymtests	1o
1.LDH	1o
2.GAPDH	1o
3.PGK	11
G. Enzymaktivitätsbestimmungen	12
Ergebnisse	14
A. Verteilung der Thrombozyten nach Dichtegradientenzentrifugation	15
B. Enzymaktivitäten der LDH, PGK und GAPDH bei Patienten mit CML	17
C. Enzymaktivitäten der LDH, PGK und GAPDH bei Patienten nach Splenektomie	17
D. Enzymaktivitäten der LDH, PGK und GAPDH bei Normalpersonen	18
E. Verhältnis der Enzymaktivitäten in den Fraktionen I und IV	2o
Diskussion	21
Zusammenfassung	29
Literaturverzeichnis	3o

Einleitung

Thrombozyten entstehen aus dem Zytoplasma reifer, polyploider Megakaryozyten im Knochenmark durch Fragmentation. Die Megakaryozyten selbst stammen von einer multipotenten Zelle ab, die sich noch in eine erythrozytäre,myeloische und megakaryozytäre Linie differenzieren kann. Die Megakaryozytenreihe beginnt beim Megakaryoblasten mit unreifem Zytoplasma, aber schon polyploiden Kernen (Stadium I), geht über die Zwischenform des Promegakaryozyten mit basopjilem Plasma (Stadium II) in den azidophilen,plättchenproduzierenden Megakaryozyten über (Stadium III). Megakaryozyten, die ihr gesamtes Zytoplasma abgegeben haben und nur noch aus polyploiden Kernen bestehen, werden als "nackte Kerne" bezeichnet (Stadium IV) (19,31,55,62,124).

Die reifen Megakaryozyten lagern sich am Sinusendothel an. Durch Endothellücken gelangen Zytoplasmaausläufer in das Sinuslumen, von diesen werden die reifen Plättchen abgeschwemmt (13,184,201). Aber nur ca. 60% der Plättchen zirkulieren frei im Blut. Ungefähr 30% der Thrombozyten werden normalerweise in der Milz gespeichert,es findet ein ständiger Austausch zwischen den beiden Kompartimenten statt (6,7,68, 84,107,109,113,163,197). Die Plättchenverteilung zwischen Blut und Milz kann indirekt gemessen werden durch Bestimmung des Anteils der mit ^{51}Cr markierten Plättchen, die kurz nach der Thrombozyteninfusion im Blutkreislauf übriggeblieben sind (84,197). Eine Splenomegalie, z.B. bei myeloproliferativen Erkrankungen, führt zu einer vermehrten Speicherung in der Milz. Es besteht ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen Milzgröße und dem Prozentsatz der frei zirkulierenden Plättchen (2,28,84,115,197). In Fällen massiver Splenomegalie können nur noch bis zu 10% oder weniger frei zirkulierende Thrombozyten gefunden werden.

Die in der Literatur angegebenen Werte der täglich gebildeten Plättchen schwanken zwischen 20 000 und 48 000 Plättchen/mm^3/Tag (48,84,145). Die Plättchenproduktionsrate

ist unter anderem reguliert durch Veränderungen der Mega=karyozytenentwicklung(58,84,124,152,160).Ziel ist die Auf=rechterhaltung der normalen peripheren Plättchenzahl(58,84, 124,153,160).Thrombozyten haben normalerweise eine schei=benförmige Gestalt mit einem Durchmesser von 2-4μ,einer Dicke von 0,5-0,75μ,und einem Volumen von 5-12μ^3(19,87, 91,97,127,174).Sie enthalten die meisten üblichen Zellbe=standteile,ausgenommen DNA,da sie selbst keine Kerne be=sitzen(11,19,97,200).Es sind jedoch Zellorganellen vorhan=den,z.B. Mitochondrien,sogenannte " dense bodies ",Granula und Teile von endoplasmatischem Retikulum(19,87,125,127,174). Ihr Stoffwechsel ist dabei differenzierter als jener der ebenfalls kernlosen Erythrozyten,die keine Mitochondrien und Mikrosomen enthalten(148).Die Thrombozytenüberlebenszeit beträgt 9 - 11 Tage,gemessen mit ^{51} Cr (Natrium-Chromat) (1,6,65,84).

Untersuchungen über den Kohlehydratstoffwechsel zeigten, daß die Plättchen einen Embden-Meyerhof-Weg(77,96,121), einen Hexose-Monophosphat-Shunt(154) und einen Weg der Gluconeogenese enthalten(100,123).Dagegen gibt es keinen 2,3-diphosphoglyzerat-Shunt(19).Die Enzyme des Embden-Meyer=hof-Wegs,z.B. die LDH (Lactat-Dehydrogenase),PGK (Phospho=glyceratkinase)und GAPDH (Glyzeraldehyd-3-phosphat-Dehydro=genase) waren schon Gegenstand früherer Untersuchungen(54, 77,93,99,101,131,141,190,191).

Im Verlauf zahlreicher Erkrankungen verschiedener Ursa=chen kommt es zu einer Erhöhung der Thrombozytenzahlen.Es ist sinnvoll,die Thrombozytosen in reaktive oder reversible und autonome Verlaufsformen zu unterteilen.

Reaktive Formen treten auf nach akutem Blutverlust,Ver=brennungen,Eisenmangelanämien,nach Operationen,speziell nach Splenektomien,und bei einigen,nicht hämatologischen, malignen Erkrankungen.Sie sind oft mit thromboembolischen Komplikationen verbunden(21,30,34,84,89,108,109,139,159, 164,166,179,180,185).

Autonome Thrombozytosen, auch als Dysthrombozytosen bezeichnet (75), sind häufig bei Erkrankungen des myeloproliferativen Formenkreises zu finden (39,47,67,79,80,84,115,118,133,158,197). Der Begriff der myeloproliferativen Erkrankungen wurde von Dameshek 1951 eingeführt (47). Dazu gehören unter anderem die chronisch myeloische Leukämie (CML), die Polyzythämia Vera (PV) und die primäre Thrombozythämie (PT) (47,63,79,115,193,197). Sie können sowohl mit Thrombosen als auch mit einer hämorrhagischen Diathese einhergehen (21,75,120).

Eine Differenzierung der Thrombozytosen ist auch durch das unterschiedliche Verhalten der Megakaryozyten möglich: bei der reaktiven Form zeigen die Megakaryozyten ein kleineres mittleres Volumen und eine niedrigere Endomitoserate als normal, umgekehrt proportional zu der größeren Plättchenzahl. Im Gegensatz dazu weist ein großes Megakaryozytenvolumen und hohe Endomitoserate trotz hoher Plättchenzahl bei den Dysthrombozytosen, auf den autonomen Charakter dieser Erkrankungen hin (84).

Es gibt in der Literatur zahlreiche morphologische und funktionelle Untersuchungen an Plättchen bei Thrombozytosen im Verlauf myeloproliferativer Erkrankungen (18,32,35,37,39,44,53,63,75,79,87,115,118,122,125,126,127,137,147,171,172,175,193,197,198,203). Eine biochemische Charakterisierung dieser Plättchen steht noch aus.

In dieser Arbeit werden Untersuchungsergebnisse an Thrombozyten verschiedener Dichte bei Patienten mit reaktiver Thrombozytose nach Splenektomie und Patienten mit Erhöhung der Plättchenzahl bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) mitgeteilt. Diese werden mit Befunden an Normalpersonen, die bereits in einer vorangegangenen Arbeit berichtet wurden, verglichen.

Im einzelnen werden untersucht:
Die Verteilung der Plättchen über fünf Gradienten verschiedener Dichte,

und die Enzymaktivitäten der LDH ,PGK und GAPDH in jeder der fünf Schichten.

Uns interessierte vor allem die Frage,ob es einen Hinweis gab auf eine Enzymalterung in Thrombozyten,sowohl bei Normalpersonen als auch bei Patienten mit erhöhter Plättchenzahl bei CML und nach Splenektomie.Eine solche Alterung konnte bereits für Erythrozyten zuverlässig nachgewiesen werden (132).

Methodik

A) Geräte:

Für alle Arbeitsgänge wurden silikonisierte Pipetten, Reagenz- und Zentrifugengläser verwendet. Zur Silikonisierung der Glaswaren wurden die gereinigten Teile mit Silikonöl 2 ml auf 1oo ml, Tetrachlorkohlenstoff = I:5o ausgespült und 4 Stunden bei 2oo ° C eingebrannt.

Die optischen Tests wurden in einem Eppendorf Photometer, verbunden mit dem Küvettenwechselautomaten Nr. 27o7, der Transformationsstufe L 1835, dem Kompensationsschreiber 4412 und einem Filter von 366 nm (Fa. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Küvetten mit einer Schichtdicke von Icm wurden auf konstant 25°C temperiert. Die Zentrifugation zur Isolierung der Thrombozyten erfolgte in einer Sorvall RC-2-B superspeed Zentrifuge bei 2o°C mit einem schrägen Winkelarbeitskopf. Die Gradientenzentrifugation der Stammsuspension erfolgte in einer Beckman Ultrazentrifuge mit Schwingrotor SW 39 (horizontaler Winkelarbeitskopf) bei 2o°C. Die Thrombozytenzählung wurde in einer Neubauerkammer im Phasenkontrastmikroskop durchgeführt.

B) Reagentien:

Ampuwa = pyrogenfreies Aqua bidestillata (Fa. Fresenius KG Hamburg),
Na 2 EDTA p.a. 5g% in aqua dest. (Fa. Merck, art.8418),
Ficoll 4oo (Pharmacia fine Chemicals),
Plaxan zur Thrombozytenzählung,
Gesättigte wässrige Digitoninlösung,
Folgende Substanzen der Fa. Böhringer MANNHEIM :
NADH
ATP
PGK
GAPDH
Selbst hergestellt wurden:

Waschpuffer: 1ooo mg Glukose
5,5 ml 1M K_2HPO_4
11,7 ml NaH_2PO_4 (1M)
8 g NaCl
in 5oo-75o ml Aqua dest. geben, gut mischen, auf pH 6,5 einstellen und auf 1 l auffüllen. Auf 29o - 3oo mosm einstellen.

Resuspensionspuffer:
1ooo mg Glucose
5,5 ml 1 M K_2HPO_4
19,4 ml 1 M Na_2HPO_4
3,7 ml 1 M NaH_2PO_4
7,6 g NaCl
in 5oo-75o ml Aqua dest. geben, gut mischen, auf pH 7,5 einstellen, auf 1 l auffüllen. Auf 29o-3oo mosm einstellen.

Triäthanolamin-Puffer:
18,6 g TRH (Triäthanolaminhydrochlorid)
4,o g Titriplex III EDTA
42,o ml 1 N NaOH
auf pH 7,5 einstellen und auffüllen auf 1 l.

C) Abkürzungen:
ATP:Adenosintriphosphat
GAPDH:Glyzeraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
LDH:Lactat-Dehydrogenase
$NADH+H^+$:Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid reduziert
PGK:Phosphoglycerat-Kinase
3-PGS:3-Phosphoglycerat
TRAP:Triäthanolamin-Pufferlösung

D) Gewinnung und Vorbereitung der Thrombozyten.

Punktion einer oberflächlichen Hautvene und freies Eintropfenlassen von I8 ml Venenblut bei ungestautem Arm in ein mit 2 ml 5%igem Na_2EDTA-Lösung vorbereiteten silikonisierten Zentrifugengläschen von 3o ml. Verschliessen mit Parafilm und sofortiges Mischen. Abtrennung des thrombozytenreichen Plasmas nach Baenziger und Majerus (1o) durch Zentrifugation bei 2o° C und 750-I000 U/min= I2Ig, I0 min lang.
Abpipettieren des plättchenreichen Überstands mit silikonisierter Pipette mittels Peleusball und in spitzen Zentrifugengläsern sammeln. I5 min lang bei 2000 U/min = 480 g, 2o° C zentrifugieren, dabei setzen sich die Thrombozyten am Boden des Gefässes ab. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert, und der Bodensatz mit 6 ml Waschpuffer aufgeschwemmt. Vorsichtiges Aufrühren mit Holzstäbchen oder Pipette. Zentrifugation bei 3000/U/min = 1085 g, I0 min. Überstand vorsichtig mit Wasserstrahlpumpe absaugen. Durch Aufschwemmen des Bodensatzes in 2 ml Resuspensionspuffer erhält man die Stammsuspension.

E) Zählung der Thrombozyten nach Brecher und Cronkite (33).
In eine Leukozytenpipette Stammsuspension b is zur Marke o,5 aufziehen, bis zur Marke II mit Plaxan nachziehen. Die Pipette wird 3 min geschüttelt. Die ersten 3 Tropfen des Pipetteninhaltes verwerfen. Die Suspension in eine Neubauerkammer bis zur Überlaufrinne einfliessen lassen. Die gefüllte Kammer waagrecht in eine feuchte Kammer legen und 2o min sedimentieren lassen. Die Zählung erfolgt im Phasenkontrastmikroskop.

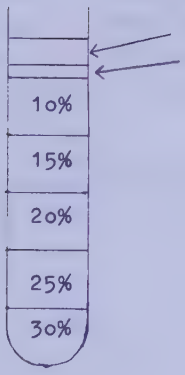
F) Dichtegradientenzentrifugation.

Zur diskontinuierlichen Gradientenzentrifugation wird

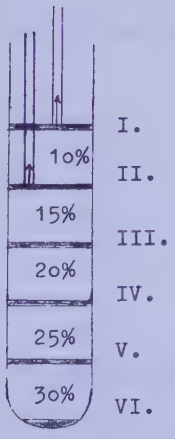
Ficoll 400 in Resuspensionspufferlösung pH 7,5 in 30, 25,20,15 und 10% -iger Konzentration gelöst,entsprechend einer spezifischen Dichte von 1105,1084,1072, 1060 und 1045 nach Petschow et al.(165).Dichtebestimmung in geeichten 5o ml Aerometern.
Die Gradienten werden in 3 Nitrocelluloseröhrchen von Beckmann,passend für Rotor SW 39 übereinandergeschichtet (165).Während des Überschichtens stehen die Röhrchen in Eis,das Ficoll wird in Spritzen gefüllt.Schräganschliff einer 1er Kanüle planschleifen.Der Ficollgradient wird mit dieser Kanüle aufgetragen,dabei immer plan auf die vorhergehende Schicht aufgesetzt.Die Kanüle darf die Schicht berühren,aber nicht eintauchen.Das Ficoll sehr langsam auftragen,pro Röhrchen von jedem Gradienten 0,8ml,beginnend mit 30 %,siehe Schema.Es bilden sich gut sichtbare Grenzlinien.Auf dem 10%-igen Gradienten o,1 ml Stammsuspension schichten.Austarieren der Röhrchen mit Stammsuspension oder Resuspensionspuffer.Zentrifugation bei 4°C mit 2500 U/min = 1000g,45min lang.Auf den Grenzlinien setzen sich je nach ihrer Dichte die Thrombozyten ab.
Mit einer Pasteurpipette und Peleusball werden die einzelnen Scichten abgehebert,dabei immer durch die Schichten durchstechen. Am Rand entlang fahren und mäanderförmig über die gesamte Fläche.Die Zellen in Plastikröhrchen oder silikonisierten Zentrifugengläschen sammeln.Die letzte Fraktion (VI) enthielt vor allem Ery = throzyten und Zelltrümmer und wurde deshalb verworfen.
Pro Schicht ein Röhrchen,auswaschen des Ficoll-Rückstandes in der Pipette mit ca. 6 ml Waschpuffer.15 min bei 2500 U/min = 1000g abzentrifugieren,Überstand absaugen.Der Bodensatz wird mit 0,6 ml Resuspensions=

puffer aufgeschwemmt und mit einem Holzstäbchen umgerührt. Es folgt aus jedem Röhrchen die Zählung der Thrombozyten nach Brec her und Cronkite.(33)

Schema zu F:



Nach Zentrifugation:
Bis auf die Thrombozytenschicht durchstechen, dann erst ansaugen.



Von oben:
Am Rand entlang und mäanderförmig die ganze Schicht abhebern.

G) Herstellung des Thrombozytencytolysats nach Waller et al (19o).

Aus jedem der 6 Röhrchen werden in je ein Zentrifugenglas o,5 ml Thrombozytensuspension eingefüllt. Dazugegeben werden je

o,25 Aqua bidest.
o,175 ml TRAP o,1 M pH 7,5
o,o75 ml Digitonin

Die Röhrchen bleiben 6o min lang im Kühlschrank. Danach erneute Zentrifugation bei 3000 U/min = 1o85 g, 2o min. Abschliessend wird der Überstand jedes Röhrchens einzeln in silikonisierte Reagenzgläser dekantiert, der Bodensatz verworfen.

H) Messung der Enzymaktivitäten im Eppendorf Photometer bei 366 mm, 25 C und Schichtdicke I cm.

I) LDH nach Kubowitz (112),
2) GAPDH nach Delbrück (5o),
3) PGK nach Vogell (188).

Ansätze:

LDH: Gesamtvolumen: 1,54 ml
o,1 M TRAP pH 7,5
0,141 µmol NADH
Start mit 2,66 µmol Pyruvat.
Messung der Extinktionsänderung gegen die Zeit auf dem Direktschreiber.

GAPDH: Gesamtvolumen: 1,46 ml
o,o5 M TRAP pH 7,5
o,35 µmol NADH
o,47 µmol 3 PGS
246,48 µmol $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
o,1 mg PGK
o,o5 ml Cytolysat
Start mit 3,31 µmol ATP.
Messung der Extinktionsänderung gegen die Zeit auf dem Direktschreiber.

PGK: Gesamtvolumen: 1,46 ml
o,o5 M TRAP pH 7,5
o,35 µmol NADH
o,47 µmol 3 PGS
246,48 µmol $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
o,1 mg GAPDH
o,o5 ml Cytolysat
Start mit 3,31 µmol ATP
Messung der Extinktionsänderung gegen die Zeit auf dem Direktschreiber.

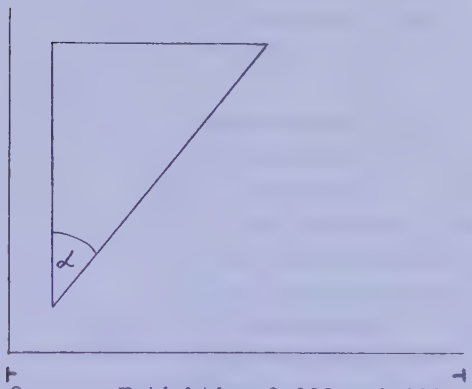
Enzymaktivitätsbestimmungen:

A) Gerätekonstanten:

Eppendorf Photometer mit Direktschreiber, Extinktionsbereich auf 0,000 bis 1,000 geschaltet.
Küvettenschichtdicke 1 cm ,
Filter 366 mm ,
Temperatur 25° C ,
Papiervorschub des Direktschreibers o,5 cm/min.

B) Faktorenberechnung:

Papiervorschub o,5 cm/min ,
Papierbreite 2o cm bei einem Extinktionsbereich von 0,000 bis 1,000 ,
Molarer Extinktionskoeffizient von NADH H bei 366 nm: $3{,}3 \times 10^6$,
Verdünnung 2:1 .



1. $\tan \alpha = \frac{A}{B}$
2. $A = B \times \tan \alpha$
3. $B = 0{,}5$ cm/min

$$\frac{A(cm)}{\Delta E} = \frac{2o}{1{,}000}$$

$$\Delta E = \frac{A \times 1{,}000}{2o}$$

ZZ: Zellzahl in Mio/mm^3 in der Zellsuspension vor Zytolyse,
ΔE: Extinktionsänderung ,
E-k: molarer Extinktionskoeffizient .

Enzymaktivität:

$$= \Delta E \times \text{Verdünnung} \times \frac{100}{ZZ} \times \frac{1}{E\text{-}k} \times \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{Einsatz}}$$

$$= \frac{A \times 1.000}{20} \times \text{Verdünnung} \times \frac{100}{ZZ} \times \frac{1}{3{,}3 \times 10^6} \times \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{Einsatz}}$$

$$= \frac{0{,}5 \times 100 \times 2 \times \text{Gesamtvolumen}}{20 \times 3{,}3 \times \text{Einsatz}} \times \frac{\tan \alpha}{ZZ}$$

$$= F \times \frac{\tan \alpha}{ZZ}$$

Für die Faktoren zur Berechnung der Thrombozytenenzym= aktivitäten ergeben sich folgende Werte :

LDH : 46,67
PGK : 45,76
GAPDH : 45,76

Die Einheit der Enzymaktivität ist:
μmol Substratumsatz/min x 10^{11} Zellen
= IU/10^{11} Zellen.

Ergebnisse :

Untersucht werden die Enzyme LDH, PGK, GAPDH in jeweils fünf Thrombozytenfraktionen an drei Gruppen.

Gruppe A: 16 Patienten mit CML
Gruppe B: 3o Patienten mit Splenektomie
Gruppe C: 32 Normalpersonen

Die mittlere Thrombozytenzahl belief sich bei

Gruppe A	930 000 / µl	Venenblut
Gruppe B	744 000 / µl	"
Gruppe C	311 000 / µl	"

Fast alle Patienten mit CML waren Philadelphia Chromosom positiv. Meist war eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Splenomegalie vorhanden.
Die alkalische Leukozytenphosphatase war fast durchweg erniedrigt.

Im Knochenmark war bei allen Patienten mit CML eine erheblich gesteigerte Granulopoese mit zum Teil zahlreichen Promyelozyten und Basophilen nachweisbar.
Die Erythropoese war durchweg vermindert.
Bei der Thrombopoese fanden sich keine einheitlichen Ergebnisse.
Es waren in Zahl und Form unveränderte Zellen zu sehen, aber auch eine Vermehrung der Megakaryozyten unterschiedlichen Reifungsgrades, mit z.T.Überwiegen der jungen Formen war festzustellen.

Die meisten Patienten in Gruppe B waren an M.Hodgkin erkrankt und wurden aus diesem Grunde splenektomiert. Die bei einigen dieser Patienten durchgeführten Sternalpunktionen ergaben keine pathologischen Befunde.

Die Thrombozytenmischsuspension wurde auf das 6 bis 8-fache angereichert, anschliessend im Ficoll-Gradienten in 5 Fraktionen verschiedener Dichte aufgetrennt. Den höchsten Thrombozytenanteil in Prozent enthielt bei allen drei Gruppen die Fraktion IV mit der Dichte 1084. Es fanden sich Werte zwischen 66,42 und 69,72 %. Die spezifisch schwerste Fraktion VI, entsprechend 3,26 % bei Gruppe A, 4,96 % bei B und 9,48 % bei C, enthielt vor allem Zelltrümmer und Erythrozyten, sie wurde deshalb verworfen.

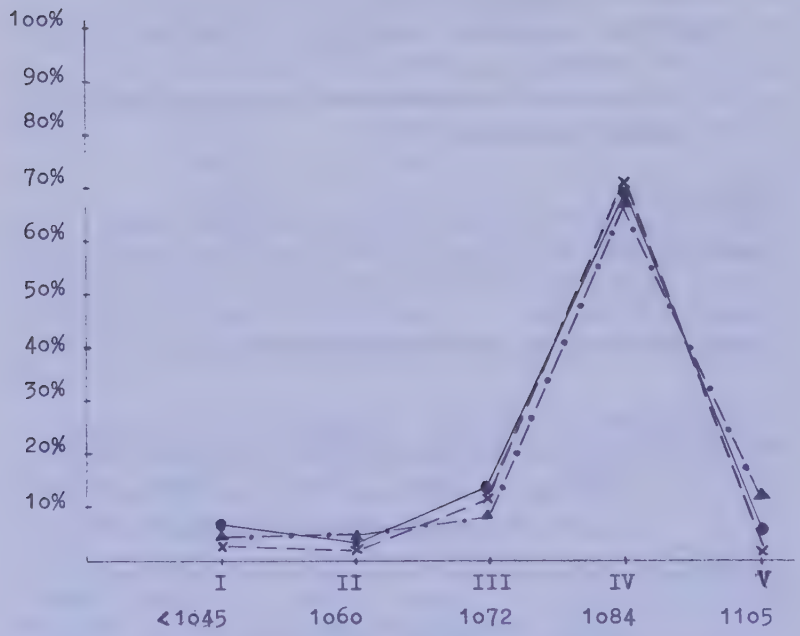
Tabelle 1 :
Verteilung der Thrombozyten nach Dichtegradienten = zentrifugation auf Ficoll 400 (Dichte 1045-1105) in %.

Gruppe A, B und C.
Jeweils Mittelwerte und Standardabweichung.

		I	II	III	IV	V
A	MW	4,68	4,99	8,41	66,42	12,24
	$\bar{S}$	± 3,58	±3,79	± 5,78	± 22,6o	± 11,1
B	MW	6,11	4,16	13,o9	66,44	5,22
	$\bar{S}$	± 5,48	±3,6o	± 9,32	± 15,3	± 5,28
C	MW	3,2	3,6	12,4	69,72	1,6
	$\bar{S}$	± 2,2	±2,o	± 6,7	± 12,3	± 1,3

Abbildung 1.

Graphische Darstellung der Verteilung der Plättchen in den drei Gruppen: hier jeweils nur die Mittelwerte eingetragen.



Verteilung nach Dichtegradientenzentrifugation auf Ficoll 400 (Dichte 1045 - 1105).

Gruppe A = ▲—•—

Gruppe B = ● ——

Gruppe C = × — —

Ordinate: % Thrombozyten.

Die Enzymaktivitäten der von uns bestimmten Enzyme LDH, PGK und GAPDH in den fünf Fraktionen für Normalpersonen, Patienten mit CML und nach Splenektomie sind in den Tabellen 2 - 4 bzw. den Abbildungen 2 - 4 zu entnehmen.

Die höchsten Aktivitäten fanden sich ungeachtet der großen Streuung durchweg in der Schicht vier. Dabei ergaben sich keine bedeutenden Unterschiede zwischen Normalpersonen und Patienten mit erhöhten Thrombozytenzahlen.

Tabelle 2.

Enzymaktivitäten in Thrombozyten bei 16 Patienten mit CML. Angaben in IU/1o^{11} Thrombozyten. n = 16, Temp.= 25°C; ± Standardabweichung.

	Fraktionen				
	I	II	III	IV	V
LDH	11o,49 ±74	11o,3 ±91	222,9 ± 123	4o7,5 ± 179	349,8 ± 233,3
PGK	182,1 ± 122	163,87 ± 111,3	219,43 ± 1oo	353,1 ± 138	235,8 ± 11o
GAPDH	1o3,9 ±6o	135,5 ± 114	122,9 ±95	37o,6 ± 131	255,3 ±134.3

Tabelle 3.

Enzymaktivitäten in Thrombozyten bei Patienten nach Splenektomie. n = 3o

	Fraktionen				
	I	II	III	IV	V
LDH	1o8,o ± 52	166,2 ± 98,2	281,6 ± 15o,3	449,7 ± 153	156,6 ± 91,2
PGK	1o7,9 ± 52	185,5 ± 117,8	22o,8 ± 171,1	289,7 ± 123	153,22 ± 118
GAPDH	123,1 ± 54	168,1 ± 71,7	176,35 ± 61,7	27o,9 ± 172	1o8,1 ± 6o,3

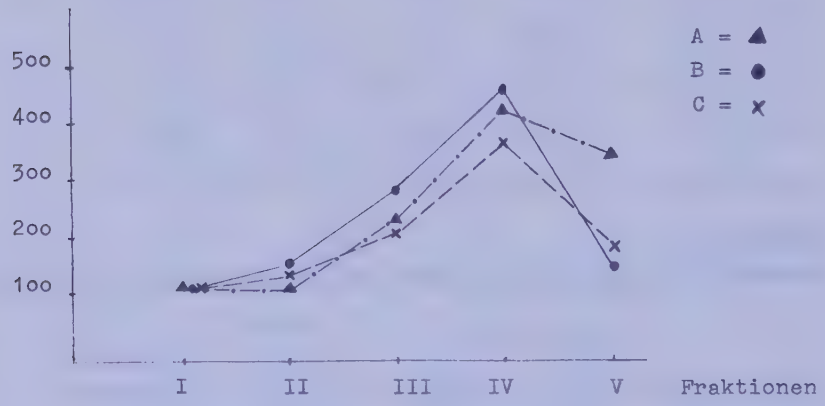
Tabelle 4.

Enzymaktivitäten in Thrombozyten bei Normalpersonen n = 32

	Fraktionen				
	I	II	III	IV	V
LDH	± 106,3 ± 46,7	± 123,9 ± 58,4	± 205,0 ± 110,3	± 365,4 ± 161,0	± 179,5 ± 89,3
PGK	± 159,0 ± 88,7	± 148,6 ± 73,0	± 267,7 ± 166,0	± 461,7 ± 193,3	± 214,9 ± 113
GAPDH	± 130,3 ± 64	± 86,7 ± 35,2	± 267,7 ± 110,2	± 441,6 ± 169	± 214,6 ± 77,2

Abbildung 2.

Vergleichende Darstellung der Aktivitäten der LDH der Gruppen A, B, C



Ordinate: Enzymaktivitäten in I.U./10^{11} Thrombozyten.

Abbildung 3.

Vergleichende Darstellung der Aktivitäten der PGK der Gruppen A, B, C

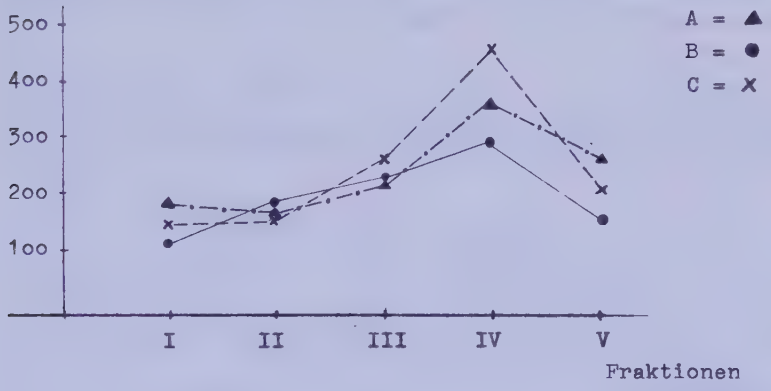
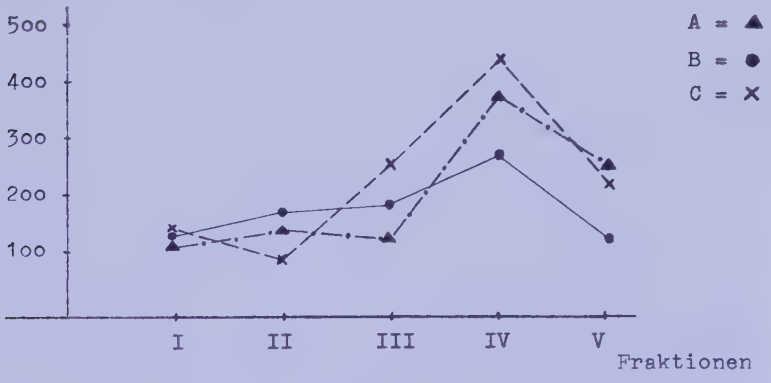


Abbildung 4.

Vergleichende Darstellung der Aktivitäten der GAPDH in den Gruppen A, B, C



Ordinate: Jeweils Enzymaktivitäten in I.U./$1o^{11}$ Thrombozyten.

Das Verhältnis der Enzymaktivitäten bei den drei Gruppen in den Fraktionen I und IV beläuft sich bei den untersuchten Enzymen auf 1 : 2 bis 1 : 4.

Tabelle 5.

Verhältnis der Enzymaktivitäten in Fraktion I und IV :

	LDH I / IV	PGK I / IV	GAPDH I / IV
CML	1 : 3,7	1 : 2	1 : 3,4
Splenektomie	1 : 4	1 : 2,5	1 : 2,2
Normalpersonen	1 : 3,5	1 : 2,8	1 : 3,4

Diskussion

Bisher fanden sich in der Literatur nur wenige Untersuchungen über Thrombozyten verschiedener Größe (25,26,97,98). Inerte Öle (97,139,14o,146),Albumin (40,92,150,192),Sucrose (22,25,26,27,1o4,187),und Stractan (41,42,43) waren die hauptsächlich verwendeten Materialien bei früheren Techniken zur Auftrennung von Blutplättchen. Die Arbeit mit diesen Substanzen war mit den unterschiedlichsten Schwierigkeiten verbunden.
Inerte Öle isolieren Plättchen von Vollblut (97,139,140, 146), aber bei einer niedrigeren Dichte als Ficoll. Dieser Unterschied könnte durch eine Veränderung des Zellvolumens durch das Öl bedingt sein. Vor allem sind die inerten Öle schwer von den Plättchen zu trennen (43).
Eine Gradientenzentrifugation mit Albumin zerstört erheblich die Plättchenmorphologie (3,92,134,192,2o4). Die Aufbereitung des Gradienten mit Ficoll ist wesentlich einfacher als mit Albumin (40,43,165), auch hat Ficoll keinen osmotischen Effekt wie Sucrose (104,189). Sucrose und Saccarose sind hyperosmolar und beeinträchtigen die Zellintegrität, Zellwasser und Enzyme gehen verloren (3,22,27,41,43,181,182) und es treten ultrastrukturelle Veränderungen auf (22,26,27).
Die Auftrennung der Thrombozyten in fünf Fraktionen erfolgte bei uns in Anlehnung an früher beschriebene Methoden (25,27, 165,187),durch Differentialzentrifugation über einen diskontinuierlichen Ficollgradienten nach Petschow et al.(165)
Das Polysaccharid Ficoll gewährleistet die Herstellung ausreichender Dichtegradienten bei normaler Viskosität.
Zur Antikoagulation von frisch gewonnenem Vollblut kann entweder ACD (5,6,8,9,25,26,27,41,43,65,143) oder EDTA (44,86, 104,134,146,167,195,202) den silikonisierten Blutröhrchen zugesetzt werden. Bei beiden Substanzen trat eine Änderung der Plättchenoberfläche von discoid zu sphärisch ein (15,65,202). Wir verwendeten Na-EDTA aufgrund von Untersuchungen von Zucker & Borelli und Mason (134,202),die die Wichtigkeit des

Magnesiums für die Plättchenagglutination betonten und die Hemmung dieser Agglutination durch Na-EDTA(195). Außerdem verklumpten die Thrombozyten mit Na-EDTA weniger als mit ACD.

Frühere Untersuchungen an Plättchen wurden bei 4°C durchgeführt(24,25,26,27,40,97,98).Andere arbeiteten bei Raumtemperatur,da gezeigt werden konnte,daß Kälte zu Oberflächenveränderungen der Thrombozyten,erhöhter Aggregation und Verlust von Plättcheninhalt führte(9,12, 38,65,92,105,128,129,142,143,144).

Nach Differentialzentrifugation der Thrombozyten fanden sich sowohl für die Normalpersonen als auch für die Patientengruppen mit CML und Splenektomie 75-80% der Thrombozyten in einer Dichte zwischen 1072 und 1084 bei unseren Untersuchungen.Auch bei den übrigen Dichtegradienten ergab sich kein wesentlicher Unterschied im Verhalten derPlättchen bei den Patienten im Vergleich mit den Normalpersonen.

Die bei anderen Arbeitsgruppen gefundenen Werte über die Dichteverteilung von Blutplättchen weichen nicht unerheblich davon ab. Bei Karpatkin et al.(97) waren nur 20% der Thrombozyten schwerer als 1055,Nicholls(150) dagegen fand eine Verteilung der Plättchen über 1092,Minter und Ingram(139) von 1010 bis 1050 mit einer mittleren Dichte von 1018.Petschow et al.(165) beschrieben eine gleichmäßige Verteilung über einen Dichtegradientenzwischen 1045 und 1090 unter Anwendung der auch von uns benützten Methode.

Nach Dichtegradientenzentrifugation wurde bei uns die Verteilung der Thrombozyten durch Auszählung nach Brecher und Cronkite(33) bestimmt,während Petschow et al.(165) eine einfache Trübungsmessung verwendeten,bei der auch Plättchentrümmer erfaßt werden können.Auch bezügluch der Zentrifugationsgeschwindigkeit waren große Unterschiede festzustellen.Karpatkin(97) verwendete für die Auftrennung 5900g,Petschow(165) 2000g,Nicholls nur 400g,während wir in Übereinstimmung mit Dicke(52) bei 1000g zentrifugierten.

Die Differenzen in der Verteilung,die von den verschiedenen Arbeitsgruppen mitgeteilt werden,sind unseres Erachtens durch die unterschiedlichen Aufarbeitungs- und Auftrennungsmethoden der Thrombozyten erklärbar.Wir erreichten erst nach Entnahme des Venenblutes mit 5%-igem Na-EDTA,weiterer Präparation bei Zimmertemperatur und schonender Zentrifugation gute Ausbeuten und reproduzierbare Ergebnisse(9,10, 128).

Schon bei Untersuchungen von Thrombozyten bei Normalpersonen und gesunden Versuchstieren fällt eine Heterogenität auf,in Bezug auf:

physikalische Parameter wie Dichte und Volumen(4,14,15, 17,20,24-27,41,43,51,69,70,72,97,103,108,138,139,146,158, 161,162,167),

biochemische Größen(4,24-27,70,72,78,97,98,99,102,155, 158,165,178),

hämostatische Wirkungen(70,90,98,158,170).

Bisher machten viele Autoren die verschiedene Alterszusammensetzung der Thrombozytengesamtpopulation für diese Unterschiede verantwortlich(40,51,60,70,97,98,99,102,152,153,192). Dabei sollten die jüngsten Plättchen zugleich die stoffwechselaktivsten,größten und dichtesten sein(40,97,98,99,102, 155,168,170,178,196,198).Bei Annahme dieser Hypothese würde eine Population großer junger Plättchen mit einem verminderten Alter und reduzierter Plättchenüberlebenszeit verbunden sein(144,157,158).

Krankheiten,die einen erhöhten Anteil an jungen Plättchen aufweisen aufgrund vermehrter Zerstörung,verbunden mit verkürzter Lebenszeit(8,29,31),oder plötzlichem Ausschwemmen junger Zellen,sollten nach der These,daß die jungen Plättchen die großen sind,von einer Makrothrombozytose begleitet sein.Dies ist der Fall bei der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura(ITP)(66,67,82,84,85,144),bei der erblichen Makrothrombozytopathie des Bernard-Soulier-Syndroms(46,74) und während der Regenerationsphase nach experimentell aus=

gelöster Thrombozytopenie(51,70,82,108,138,139).Aber bei den obengenannten Erkrankungen treten auch Veränderungen in der Thrombopoese auf,die auch für die Entstehung der Makrothrombozytose mitverantwortlich sein könnten.Außerdem wurde eine Makrothrombozytose auch bei normaler Plättchenüberlebenszeit bei einigen angeborenen Krankheiten mit verminderter Gesamtplättchenzahl festgestellt,zum Beispiel der May-Hegglin'schen Anomalie und der Mediterranen Makrothrombozytose(14,15,46,71,85,110,144).Dagegen wiesen Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom(WAS) eine Mikrothrombozytose auf,obwohl sie eine junge Plättchenpopulation mit verkürzter Überlebenszeit hatten(73,144).

Das Volumen der Plättchen bei Normalpersonen hat eine logarithmische Verteilung(157,158).Auch Thrombozyten,die weniger als 3-10 Tage alt sind weisen schon diese Verteilungsform auf.Dies bedeutet,daß diese Größenanordnung schon bei der Thrombozytopoese oder kurz nach der Plättchenfreisetzung festgelegt wird.Das ist ein Hinweis dafür, daß die Alterung in der Blutzirkulation die Volumenverteilung nicht beeinflußt.Nicht zuletzt:wäre eine Makrothrombozytose bei erhöhter Destruktion nur auf das jugendliche Alter der Plättchen zurückzuführen,könnte eine kleinere Verteilungsbreite der Volumina erwartet werden,da junge Plättchen eine viel geringere Altersheterogenität haben als normale Plättchenpopulationen.Paulus konnte im Gegensatz zu dieser Vorstellung bei Hyperdestruktion eine größere Heterogenität der Volumina nachweisen(157,158).

Untersuchungen an Thrombozytenpopulationen unterschiedlicher Größe bei genetischen Variationen,zum Beispiel der Mediterranen Makrothrombozytose(15),der May-Hegglin'schen Reifungsanomalie(71,88,116) und verschiedenen Riesenplättchenthrombozytopathien(9,46,76,110,173,192) zeigten,daß das Produkt aus Plättchenzahl und Plättchenvolumen konstant ist(14,36).Dabei blieben sowohl bei diesen Formen,als auch bei den von Minter und Ingram(139) beschriebenen,die jungen, großen Thrombozyten bei der Alterung im Blut groß.

Weiter ergaben Untersuchungen an isolierten Thrombozytenfraktionen unterschiedlicher Dichte bei Personen und Versuchstieren mit normaler Plättchenzahl(24,27, 40,97,98,99, 102,119,148,165) und an Mischsuspensionen bei Thrombozytopathien mit signifikant abweichender Plättchengröße(9,74, 88,116,119,173,192) übereinstimmend,daß jeweils die größeren Thrombozyten höhere Stoffwechselaktivitäten,z.B. Enzymaktivitäten,als die kleineren aufwiesen.Diese Ergebnisse waren bei Bezug der Stoffwechselgrößen auf die Plättchenzahl gewonnen, bei Bezug auf das Plättchenvolumen war kein Unterschied mehr festzustellen (9,74,88,116,119,148,173).

Wie schon erwähnt,können Thrombozytosen in reaktive oder reversible und autonome Verlaufsformen unterteilt werden. Bei der reaktiven Thrombozytose nach akutem Blutverlust und nach experimentell induzierter Thrombozytopenie(70,108, 124,135,138,139,160) kommt es zu einer Zunahme der Thrombopoese durch Stimulierung der Megakaryozytenvorläuferzelle. Dies führt zu einer Zunahme des endomitotischen Indexes, somit der Ploidie und des Volumens der Megakaryozyten(31,56, 58,83,83,124,152,153,160,199).Außerdem steigt die Zahl der Megakaryozyten(83,84,160,199),die Reifungszeit wird verkürzt(57).Dadurch kommt es ab dem 3.Tag zu einer Ausschwemmung von jungen Plättchen großen Volumens(51,108,138,139,). Außerdem wirkt der stimulierende Effekt der Thrombopenie auch auf die granulahaltigen Megakaryozyten kurz vor Erreichen der normalen Reifung,aber schon nach der Replikation. Sie setzen akut große Plättchen frei,die daher bereits in den ersten zwei Tagen nach Thrombopenie in der Blutzirkulation auftreten(59,108,152,153).Die durch diesen Mechanismus freigesetzten großen Plättchen werden als "stress-platelets" bezeichnet.Sie sind zu unterscheiden von Thrombozyten,die unter normalen steady-state-Bedingungen gebildet werden, sie repräsentieren eine aberrante Population,die bei der Alterung nicht an Volumen abnimmt(108,139,162).

Auch Splenektomie führt zu einer Thrombozytose(45,84,106, 108,109,114,136,159,164,166,179,194).Die Milz speichert bei gesunden Personen ungefähr 30% der gesamten Plättchen= masse(6,7,68,84,107,109,113,163).Diese Plättchen stehen in ständigem Austausch mit den systemisch zirkulierenden Blutplättchen(7,28,107,197).Der Verlust des Thrombozyten= speichers reicht zur alleinigen Erklärung der Thrombozy= tose nach Splenektomie nicht aus,(84,109).Dieser Verlust würde nur zu einem Anstieg der Plättchenzahl um ca. 50% führen(7,19).Es muß auch eine erhöhte Produktion angenom= men werden(34,109).Dies könnte durch den Verlust eines von der Milz normalerweise produzierten Hemmfaktors bedingt sein(95).Es kommt ab dem 4.Tag nach der Operation zu einer Stimulation der Megakaryozyten und zu einem Anstieg der Plättchenzahl mit einem Maximum vom 7.-11.Tag(30,109,159, 194).Diese Plättchen sind im Gegensatz zur reaktiven Thrombozytose nach Blutverlust von normaler Größe und Dichte(84,108,109,149,156,159).

Bei den Dysthrombozytosen des myeloproliferativen For= menkreises,der unter anderem PV,CML und PT umfaßt(63,79, 115,197),sind mehr oder weniger ausgeprägte Thrombozyten= funktionsstörungen bekannt,so etwa Störungen der Aggrega= tion,Adhäsivität,Thrombinzeit,Blutungszeit,Koagulations= zeit(18,37,39,44,53,63,75,79,87,94,111,115,118,137,147, 171,172,176,183,197,203).

Auch morphologisch wurden auffallende licht- und elek= tronenmikroskopische Veränderungen an den Plättchen und Megakaryozyten gefunden.Schon lichtmikroskopisch waren neben einer ausgeprägten Anisozytose und Polymorphie der Plättchen,granuläre Riesenformen und spezifisch große "blaue Plättchen" ohne Granulationen zu erkennen.Die mei= sten dieser abnormalen Thrombozyten waren rund.Auch traten vermehrt zirkulierende,hyperplastische Megakaryozyten auf (16,32,61,75,79,115,117,120,125,126,127,131,197).

Elektronenmikroskopisch waren bei den abnormalen Plättchen und Megakaryozyten die unterschiedlichsten Veränderungen zu erkennen.Neben unspezifischen Zeichen der Unreife in Form von zytoplasmatischer Hypertrophie,fanden sich Abnormalitäten in Anzahl,Form und Anordnung der Organellen, zum Beispiel waren wenig Mitochondrien,fehlende Granula, aber auch eine Hyperplasie des endoplasmatischen Retikulums und des dichten tubulären Systems zu sehen(32,35,63, 87,122,125,126,127,175,193,197).

Bezüglich der Morphologie ergaben sich bei der CML einige Besonderheiten im Vergleich zu anderen Erkrankungen des myeloproliferativen Formenkreises.Das mittlere Megakaryozytenvolumen und die Endomitose waren eher kleiner als normal(32,63,84).In Bezug auf die Plättchengröße selbst fanden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Während einige Arbeitsgruppen vermehrt größere,abnormale Thrombozyten sahen(81,87,125,127),ergaben sich bei der von Nerke(149) gemessenen Plättchengröße keine Unterschiede zu den Werten bei Normalpersonen.

Biochemische Untersuchungen der funktionell pathologischen Plättchen stehen noch aus.Wir haben daher die Enzymaktivitäten von LDH,PGK und GAPDH bei Thrombozyten verschiedener Dichte und Größe an Patienten mit CML und nach Splenektomie untersucht,und diese mit den Ergebnissen bei Normalpersonen verglichen.Bei allen drei Gruppen fanden sich die höchsten Enzymaktivitäten in den Schichten mit der größten Dichte.

Wie bereits in einer vorangegangenen Arbeit(149) berichtet,wurde die Relation der Volumina für alle drei Gruppen in den Fraktionen I und IV mit 1:2,5 ermittelt.Das bei uns gefundene Verhältnis der Enzymaktivitäten in Schicht I und IV reicht von 1 :2,2 bis 1 : 3,5.Bezieht man also die Enzymaktivitäten zusätzlich auf das jeweilige Plättchenvolumen so verringern sich die Unterschiede ganz erheblich.Sowohl bei Patienten mit CML als auch nach Splenektomie zeigten die Plättchen in Bezug auf die von uns untersuchten Parameter keine wesentlichen Unterschiede zu den Thrombozyten bei Normalpersonen.

Schon bei Untersuchungen von Thrombozyten verschiedener Dichte und Größe, sowohl bei Normalpersonen(97,98,148), als auch bei Patienten mit Riesenplättchenthrombozytopathien(9,74,88,116,173) ergab sich bereits, daß bei Berücksichtigung des Volumens alle Plättchen annähernd gleiche Stoffwechselaktivitäten besitzen. Unsere vergleichenden Untersuchungen an Plättchen bei Thrombozytosen bei Splenektomie und CML führten zur Bestätigung dieser Ergebnisse.

Die meisten Autoren waren bisher der Auffassung, daß junge Thrombozyten größer, dichter und stoffwechselaktiver sind und im Laufe der Alterung kleiner und leichter werden, verbunden mit einer Aktivitätsabnahme(51,70,97,98,99,108,152,155,168). Nach neueren Untersuchungen ergeben sich in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen keine sicheren Hinweise auf eine Enzymalterung im Sinne einer Aktivitätsabnahme(9,108,148,157,158,162), wie sie bei Erythrozyten aufgrund der langen Lebensdauer von 120 Tagen zuverlässig nachgewiesen werden konnte(132).

Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen an Thrombozyten bei drei Personengruppen: Normalpersonen, Patienten mit Thrombozytosen nach Splenektomie und bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Patientengruppen wurden mit denen der Normalpersonen verglichen.

Die Thrombozyten jeder Gruppe wurden durch diskontinierliche Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation in fünf verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Den größten Thrombozytenanteil enthielt bei allen drei Gruppen die Fraktion IV mit der Dichte 1o84.

Weiter wurden in jeder Fraktion die Enzymaktivitäten der Laktat-Dehydrogenase (LDH), Phospholglyzerat-Kinase (PGK) und Glyzeraldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) untersucht. In allen Gruppen waren die Enzymaktivitäten in der spezifisch schwereren Fraktion IV gegenüber der spezifisch leichteren Fraktion I deutlich erhöht. Die Enzymaktivitäten in Schicht IV gegenüber Schicht I waren für die LDH in den drei Gruppen um das 3,5 bis 4-fache, für die PGK um das 2,0 bis 2,8-fache, und für die GAPDH bei Normalpersonen und bei CML um das 3,4-fache, bei Splenektomie um das 2,2-fache höher.

Bei Berücksichtigung der Plättchenvolumina, die zwischen Schicht I und IV um den Faktor 2,5 differieren, verringern sich die Unterschiede jedoch ganz erheblich.

Insgesamt ergaben sich bezüglich der von uns untersuchten Parameter keine wesentlichen Differenzen im Verhalten der Thrombozyten bei Patienten mit Thrombozytosen im Vergleich zu Normalpersonen.

Literaturverzeichnis

1 Aas, K.A., Gardner, F.H.: Survival of blood platelets labelled with 51-chromium. J. clin. Invest. 37 , 1257-1268 (1958).

2 Abrahamsen, A.F.: Effects of an enlarged splenic platelet pool in Hodgkin's disease. Scand. J. Haemat. 9 , 153-158 (1972).

3 Akkerman, J.W.N., Gorter, G., Wester, J., Sixma, J.J.: Preparation of concentrated platelet suspensions by dehydratation against polyethyleneglycol 20 000. Scand. J. Haemat. 17 , 71-77 (1976).

4 Amorosi, E., Garg, S.K., Karpatkin, S.: Heterogeneity of human platelets IV.Identification of a young platelet population with 75-selenomethionine. Brit. J. Haemat. 21 , 227-232 (1971).

5 Ardlie, N.G., Packham, M.A., Mustard, J.F.:Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in sus= pensions of washed platelets. Brit. J. Haemat. 19 , 7-15 (1970).

6 Aster, R.H., Jandl, J.H.: Platelet sequestration in man I.Methods. J. clin. Invest. 43 , 843-855 (1964).

7 Aster, R.H.:Pooling of the platelets in the spleen: role in the hypersplenic thrombocytic purpura. J. clin. Invest. 45 , 645-657 (1966).

8 Aster, R.H., Keene, W.R.:Sites of platelet destruction in idiopathic thrombocytopenic purpura. Brit. J. Haemat. 16 , 61-73 (1969).

9 Baadenhuijsen, N.L., Hirschhäuser, C., Kurstjens, R., Ewals, M., Haanen, C.: Metabolic observations on platelets from patients with familial thrombopathic thrombocytopenia. Brit. J. Haemat. 20 , 417-427 (1971).

10 Baenzinger, N.L., Majerus, P.: Isolation of human platelets and platelet surface membranes. In: Methods in enzymology,Vol. XXXI,p.149-183 (edits S.F.Colowick and N.O.Kaplan)New York,Acad.Press (1974).

11 Barber, A.J., Pepper, D.S., Jamieson, G.A.: Chemical studies of platelet membranes. Fed. Proc. 28 , 575-583 (1969).

12 Becker G.A.:
In vivo studies of platelet concentrates stored at room temperature. (Abstract)
Proc. Am. Ass. Blood Banks. 91-11o (1971).

13 Behnke, O.: An electron microscopic study of the rat megacaryocyte. 2. Some aspects of platelet release and microtubules. J. Ultrastruct. Res. 26, 111-123 (1969).

14 B ehrens, v. W.E.: Evidence ofphylogenetic canalisation of the circulating platelet mass in man. Thrombos. Diathes. haemorrh. 27, 159-172 (1972).

15 Behrens, v. W.E.: Mediterranean Macrothrombocytopenia. Blood 46, 199-2o8 (1975)

16 Bensinger, T.A., Logue, G.L., Rundles, R.W.:
Hemorrhagic Thrombocythemia. Control of postsplenectomy Thrombocytosis with Mephalan. Blood 36, 61-69 (197o).

17) Berg, R.H.: Data presentation for platelet size analysis. Blood 4o, 597-6o5 (1972).

18 Berger, S., Aledort, L.M., Gilbert, H.S., Hanson, J.P., Wassermann, L.R.: Abnormalities of platelet function in patients with polycythemia vera. Cancer res. 33, 2683 - 2687 1973.

19 Beutler, W.E., Erslew, A.J., Rundles, R.W.:
Hematology p. 999-1o54 New York, Mc Graw-Hill Book cp. (1972)

2o Bigel, P., Lellouch, J., Mayer, S., Waitz, S.:
Le diamètre thrombocytaire chez l'adulte normal.
Nouv. Rev. franc. Hêmat. 7, 9oo - 9o3 (1967).

21 Binswanger, D., Schaub, F., Scheitlin, W.:
Zur hämorrhagischen Diathese bei extremer Vermehrung der Thrombocyten. Acta haemat. 14, 382-386 (1955).

22 Boneu, B., Boneu, A., Raisson, C.J.,Guiraud, R., Biermé, R.: Kinetics of the platelet population in the stationary state. Thromb. Res. 3, 6o5-611 (1973).

23 Boneu, B., Pris, J., Raisson, C.J., Boneu, A., Biermé, R.: Kinetics of platelets of various densities in five thrombocytopenic patients.
Path. Biol. 22 suppl., 22-33 (1974)

24 Booyse, F.M., Rafelson, M.E.: Studies in human platelets II. Protein synthesis activity of various platelet populations. Biochim. biophys. Acta 157, 660-663 (1968).

25 Booyse, F.M., Hoveke, T.P., Rafelson, M.E. jr.: Density gradient separation and properties of human platelet populations. Fed. Proc. 27, 569-578 (1968).

26 Booyse, F.M., Hohn, D.C., Rafelson, M.E.: Studies on human platelets IV. Study of platelet abnormalities by density gradient separation of platelet populations. S. Afr. Med. J. 43, 964-967 (1969).

27 Booyse, F.M., Zschocke, D., Hoveke, T.P., Rafelson, M.E.: Studies on human platelets IV. Protein synthesis in maturing human platelets. Thrombos. Diathes. haemorrh. 26, 167-176 (1971).

28 Branehög, I., Weinfeld, A., Roos, B.: The exchangeable splenic platelet pool studied with epinephrine infusion in idiopathic thrombocytopenic purpura and in patients with splenomegaly. Brit. J. Haemat. 25, 239-248 (1973).

29 Branehög, I., Kutti, J., Weinfeld, A.: Platelet survival and platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Brit. J. Haemat. 27, 127-136 (1974).

30 Branehög, I.: Platelet kinetics in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) before and at different times after splenectomy. Brit. J. Haemat. 29, 413-426 (1975).

31 Branehög, I., Kutti, J., Ridell, B., Swolin, B., Weinfeld, A.: A relation of thrombokinetics to bone marrow megacaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Blood 45, 551-562 (1975).

32 Branehög, I., Ridell, B., Swolin, B., Weinfeld, A.: Megacaryocyte quantifications in relation to thrombokinetics in primary thrombocythaemia and allied diseases. Scand. J. Haemat. 15, 321-332 (1975).

33 Precher, G., Cronkite, E.P.: Morphology and enumeration of blood platelets. J. Appl. Physiology 3, 365-377 (1950).

34 Breslow, A., Kaufmann, R.M., Lawsky, A.R.: The effect of surgery on the concentration of circulating megacaryocytes and platelets. Blood 32, 393-401, (1968).

35 Breton-Gorius, J.: Development of two distinct membrane systems associated in giant complexes in pathological megacaryocytes. Ser. Haemat. 8, 49-67 (1975).

36 O'Brien, J.R., Jamieson, A.: A relationship between platelet volume and platelet number. Thrombos. Diathes. haemorrh. 31, 363-375 (1974).

37 Brodsky, K., Kahn, S.B., Ross, E.M., Petkow, G.: Platelet and fibrinogen kinetics in the chronic myeloproliferative disorders. Cancer 3o, 1444-1453 (1972).

38 Bull, B.S., Zucker, M.B.: Changes in platelet volume produced by temperature, metabolic inhibitors and aggregating agents. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 12o, 296-3o1 (1965).

39 Cardamone, J.M., Edson, J.R., Mc.Arthur, J.R., Jacob, H.S.: Abnormalities in platelet function in the myeloproliferative disorders. JAMA 221, 27o-273 (1972).

4o Charmatz, A., Karpatkin, S.: Heterogeneity of rabbit platelets I. Employment of an albumin density gradient for separation of a young platelet popolutation identificed with Se^{75}-Selenomethionine. Thrombos. Diathes. haemorrh. 31, 485-492 (1974).

41 Corash, L., Gralnick, H.R.: High yield quantitative isolation of human platelets from whole blood. Blood 44, 919-92o (1974).

42 Corash, L., Piomelli, S., Chen, H.C., Seaman, C., Gross, E.: Separation of erythrocytes according to age on a simplified density gradient. J. Lab. Clin. Med. 84, 147-151 (1974).

43 Corash, L., Tan, H., Gralnick, H.R.: Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations I. Relationship between buoyant density, cell volume and ultrastructure. Blood 49, 71-87 (1977).

44 Cronberg, S., Caen, J.P.: Platelet aggregation in washed suspensions. Scand. J. Haemat. 8, 161-172 (1971).

45 Crosby, W.H.: Hyposplenism: An inquiry into the normal function of the spleen. Ann. Rev. Med. 14, 349-362 (1963).

46 Cullum, C., Cooney, D.P., Schrier, S.L.: Familial thrombocytopenic thrombocytopathie. Brit. J. Haemat. 13, 147-158 (1967).

47 Dameshek, W.: Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood 6, 372-375 (1951).

48 Davey, M.G.: The survival and destruction of human platelets. Bibliotheca Haemat. 22, 99-115 (1966).

49 Day, H.J., Holmsen, H., Zucker, M.B.: Methods for separating platelets from blood and plasma. Thrombos. Diathes. Haemorrh. 33, 648-654 (1975).

5o Delbrück, A., Zebe, E., Bücher, Th.: Über die Verteilungsmuster von Enzymen des Energiestoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre zytologische Zuordnung. Biochem. Z. 331, 273-296 (1959).

51 Detwiler, T.C., Odell, T.T., Mc Donald, T.P.: Platelet size, ATP content and clot retraction in relation to platelet age. Am. J.Physiol. 2o3, 1o7-115 (1962).

52 Dicke, K.A., van Noord, M.J., Maat, B., Schaefer, U.W., van Bekkum, D.W.: Identification of cells in primate bone marrow ressembling the hemopoietic stem cell in the mouse. Blood 42, 195-2o6 (1973).

53 Didisheim, P., Bunting, D.: Abnormal platelet function in myelofibrosis. Am. J. Clin. Path. 45, 566-573 (1965).

54 Doery, J.C.G., Hirsh, J., Loder, P.B., de Gruchy, G.C.: Distribution of platelet hexokinase and the effect of collagen. Nature 216, 1317 - 1325 (1967).

55 Ebbe, S., Stohlman, F. Jr.: Megacaryocytopoiesis in the rat. Blood 26, 2o-35 (1965).

56 Ebbe. S., Stohlman, F. Jr., Overcash, J., Donovan, J., Howard, D.: Megacaryocyte size in thrombocytopenic and normal rats. Blood 32, 383-398 (1968 a).

57 Ebbe, S., Stohlman, F. Jr., Donovan J., Overcash, J.: Megacaryocyte maturation rate in thrombocytopenic rats. Blood 32, 787-798 (1968 b).

58 Ebbe, S.: Megacaryocytopoiesis and platelet turnover. Ser. Haemat. 1, 65-98 (1968).

59 Ebbe, S., Phalen, E.: Thrombocytopoietic regulatory mechanisms. In Greenwalt, TJ., Jamieson, G.A. (eds). Formation and destrucion of blood cells. Phil. Lippincott 128-142 (197o).

60 Evatt, R.L., Levin, J.: Measurement of thrombopoiesis in rabbits using Selenomethionine. J. Clin. Invest. 48, 1615-1626 (1969).

61 Fanger, H., Cella, L.J.Jr., Lichtman, H.: Thrombocythaemia. Report of three cases and a review of literature. New Engl. J. Med. 250, 456-461 (1954).

62 Feindegen, L.E., Odartchenko, N., Cottier, H., Bond, V.P.: Kinetics of megacaryocyte proliferation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 117-128 (1962).

63 Franzen, S., Strenger, G., Zajicek, J.: Microplanimetric studies on megacaryocytes in chronic granulocytic leucaemia and polycythaemia vera. Acta haemat. 26, 182-193 (1961).

64 Gardner, F.H., Howell, D., Hirsch, E.O.: Platelet transfusion utilizing plastic equipement. J. Lab. Clin. Med. 43, 196-207 (1954).

65 Gardner, F.H.: Platelet Kinetics and life span. Clin. Haemat. 1, 307-324 (1972).

66 Garg, S.K., Amorosi, E.L., Karpatkin S.: Use of the megathrombocyte as an index of megacaryocyte number. New Engl. J. Med. 284, 11-17 (1971).

67 Garg, S.K., Lackner, H., Karpatkin, S.: The increased percentage of megathrombocytes in various clinical disorders. Ann. int. Med. 77, 361-369 (1972).

68 Gehrmann, G.: Milz und normaler Thrombozytenhaushalt. In: die Milz (ED) Lennert K., Harms, D. p.276-293, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag (1970).

69 Georges, J.N., Sears, D.A.: Platelet membrane fragmentation as a model for platelet aging. Clin. Res. 21, 554-563 (1973).

70 Ginsburg, A.D., Aster, R.H.: Changes associated with platelet aging. Thrombos. Diathes. haemorrh. 27, 407-415 (1972).

71 Goodwin, H.A., Ginsburg, A.D.: May-Hegglin-Anomaly: A defect in megacaryocyte fragmentation. Brit. J. Haemat. 26, 117-128 (1974)

72 Goldschmidt, B., Sørland, S.J.: The young platelet population in children with cyanotic congenital heart disease. Thrombos. Haemostas. 35, 342-349 (1976)

73 Gröttum, K.A., Hovig, T., Holmsen, H.: Wiskott-Aldrich Syndrome: qualitative platelet defects and short platelet survival. Brit. J. Haemat. 17, 373-388 (1969).

74 Gröttum, K.A., Solum, N.O.: Congenital thrombocytopenia with giant platelets, a defect in the platelet membrane. Brit. J. Haemat. 16, 277-29o (1972).

75 Gross, R., Proll, G.: Über Dysthrombozytosen. Klin. Wschr. 33, 1o31-1o36 (1955).

76 Gross, R., Gerok, W., Löhr, G.W., Vogell, W., Waller, H.D., Theopold, W.: Über die Natur der Thrombasthenie. Klin. Wschr. 38, 193-2o6 (196o).

77 Gross, R., Löhr, G.W., Waller, H.D.: Genetic defects in platelet metabolism as a cause of thrombocytopathia. In Biochemistry of Blood Platelets (ed) Kowalski, E., Niewarowski, S.: New York Acad. Press p.161-19o (1967).

78 Grossmann, C.M., Kohn, R.: Enzymatic charakteristics of in vitro incorporation of P^{32} orthophosphate into human platelet phosphatides. Thrombos. Diathes. haemorrh. 13, 126-133 (1965).

79 Gunz, F.W.: The myeloproliferative disorders. New Zeal. med. 57, 428-435 (1958).

8o Gunz, F.W.: Hemorrhagic thrombocythemia : A critical review. Blood 15, 7o6-723 (196o).

81 Haguenau, F., Hollmann, K.H., Levy, J.P., Bolron, M.: Étude au microscope électronique des plaquettes sanguines dans les leucémies humaines. J.Micr. 2, 529-538 (1963).

82 Harker, L.A.: Significance of platelet volume alterations. Proc. of the twelfth meeting of the international society of hematology. New York p. 2o2-215 (1968).

83 Harker, L.A.: Kinetics of thrombopoiesis. J. Clin. Invest. 47, 458-471 (1968).

84 Harker, L.A., Finch, C.A.: Thrombokinetics in man. J. Clin. Invest. 48, 963-974 (1969).

85 Harker, L.A. Platelet Kinetics in hereditary thrombocytopenia. Proc. of the thirteenth meeting of the american society of hematology. San Juan, Puerto Rico p. 261-277 (197o).

86 Haslam, R.J.: Role of adenosine diphosphate in the aggregation of human platelets by thrombin and fatty acids. Nature 202, 765-773 (1964).

87 Hattori, A., Koike K., Ito, S., Matsuoka, M.: Static and functional morphology of the pathological platelet in primary myelofibrosis and myeloproliferative syndrome. Ser. Haemat. 8, 126-150 (1975).

88 Hegglin, R., Gross, R., Löhr, G.W.: AnomalieHegglin-May (polyphyle Reifungsstörung). Schw.Med.Wschr. 94, 1357-1365 (1964).

89 Heilmeyer, L., Begemann, H.: Blut und Blutkrankheiten, in: v.Bergmann, Frey und Schwiegks. Hdb. inn.Med. 1. 334-368, Springer, Berlin 1951.

90 Hirsh, J., Glynn, M.F., Mustard, J.F.: The effect of platelet age on platelet adherence to collagen. J. Clin. Invest. 47, 466-473 (1968).

91 Hovig, T.: The ultrastructure of blood platelets in normal and abnormal states. Ser. Haemat, 1, 3-15 (1968).

92 Hutton, R.A., Howard, M.A., Deykin, D., Hardisty, R.M.: Methods for the Separation of platelets from plasma. A comparison of functional and morphological integrity. Thrombos. Diathes. haemorrh. 31, 119-132 (1974).

93 Hule, V.: Isoenzymes of lactic dehydrogenase in human platelets. Clin. Chim. Acta. 13, 431-445 (1966).

94 Incerman, S., Tangün, Y.: Platelet defects in the myeloproliferative disorders. Ann. New York Acad. Sci. 201, 251-265 (1972).

95 Jacob, H.S., Mc Donald, R.A., Jandl, J.H.: The spleen growth and sequestring function. J. Clin. Invest. 14, 133-141 (1963).

96 Karpatkin, S.: Studies on human platelet glycolysis. Effect of glucose, cyanide, insulin, citrate and agglutination and contraction on platelet glycolysis. J. Clin. Invest. 46, 409-427 (1967).

97 Karpatkin, S.: Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. J. Clin. Invest. 48, 1073-1082 (1969).

98 Karpatkin, S.: Heterogeneity of human platelets. II. Functional evidence suggestive of young and old platelets. J. Clin. Invest. 48, 1083-1087 (1969).

99 Karpatkin, S., Charmatz, A.: Heterogeneity of human platelets. III. Glycogen metabolism in platelets of different sizes. Brit. J. Haemat. 19, 135-143 (1970).

100 Karpatkin, S., Charmatz, A., Langer, R.M.: Glycogenesis and glyconeogenesis in human platelets. In corporation of glucose, pyruvate and citrate into platelet glycogen. Glycogensynthetase and fructose 1-6-diphosphatase. J. Clin. Invest. 49, 140-153 (1970).

101 Karpatkin, S., Strick, N.: Heterogeneity of carbohydrate enzymes in platelets. Clin. Res. 18, 407-419 (1970).

102 Karpatkin, S., Strick, N.: Heterogeneity of human platelets. V. Glycolytic and related enzymes with possible relation to platelet age. J. Clin. Invest. 51, 1235 - 1243 (1972).

103 Karpatkin, S.: The megathrombocyte as an index of platelet production. Brit. J. Haemat. 26, 307-311 (1974).

104 Kaulen, H.D., Gross R.: Metabolic properties of human platelet membrane. I. Characterization of platelet membranes prepared by sucrose and Ficoll density gradients. Thrombos. Diathes. haemorrh. 30, 199-214 (1973).

105 Khan, I., Zucker-Franklin, D., Karpatkin, S.: Microthrombocytosis and platelet fragmentation associated with idiopathic/autoimmune thrombocytopenic purpura. Brit. J. Haemat. 31, 449-460 (1975).

106 Koller, F., Zollikofer, H.: Der Einfluß des Adrenocorticotropin-Hormons auf die Thrombozytenzahl. Experientia 6, 299-307 (1950).

107 Kotilainen, M.: Platelet kinetics in normal subjects and in haematological disorders with special reference to thrombocytopenia and to the role of the spleen. Scand. J. Haemat. suppl. 5, (1969).

108 Kraytman, M.: Platelet size in thrombocytopenias and thrombocytosis of various origin. Blood 41, 587-598 (1973).

109 Krisza, F., Buzás, E., Rák, K.: Study of post-splenectomy thrombocytopoiesis with ^{75}Se-methionine in mice. Acta Haemat. 52, 77-82 (1974).

110 Kurstjens, R., Bolt, C., Vossen, M., Haanen, C.: Familial thrombopathic thrombocytopenia. Brit. J. Haemat. 15, 305-314 (1968).

111 Kubisz, P.: Myeloproliferative disorders and platelet functions. Folia Haemat. 99, 202-213 (1973).

112 Kubowitz, F., Ott, P.: Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren. Biochem. Z. 314, 94-117 (1943).

113 Kutti, J., Weinfeld A., Westin, J.: The relationship between splenic platelet pool and spleen size. Scand. J. Haemat. 9, 351-354 (1972).

114 Laporte A., Mallarmé J., Jaquot, A., Cohen-Solal, J.: Thrombocythémie hemorrhagipare post-splénectomie. Sang 28, 226-237 (1957).

115 Laszlo, J.: Myeloproliferative disorders. (MPD). Myelofibrosis, myelosclerosis, extra-medullary hematopoiesis, undifferentiated MPD and hemorrhagic thrombocythemia. Sem. Haemat. 12, 409-432 (1975).

116 Lechner, K., Breddin, K., Moser, K., Stockinger, L., Wenzel, E.: May-Hegglin'sche Anomalie. Acta Haemat. 42, 303-320 (1969).

117 Lewis, S.M., Szur, L., Hoffbrand, A.V.: Thrombocythaemia. Clin. in Haemat. 1, 339-357 (1972).

118 Linke, H., Hellriegel, K.P.: Plättchenfunktionsprüfungen bei chronisch myeloischer Leukämie. In: Leukämie, edits. Gross, R., v.d.Loo, J. p.405-409. Springer, Heidelberg-New York (1972).

119 Löhr, G.W., Waller, H.D., Gross, R.: Beziehungen zwischen Plättchenstoffwechsel und Retraktion des Blutgerinnsels unter besonderer Berücksichtigung der Thrombopathia Glanzmann-Naegeli. Med.Wschr. 86, 897-904, 946-950 (1961).

120 Loo, v.d. J.: Thrombozythämien und Thrombozytosen. Essentielle und symptomatische Thrombozythämien. In: Thrombozytäre Gerinnungsstörungen. IX. Hamburger Symposium 213-222 (1966).

121 Luganova, I.S., Seits, I.F., Teodorovich, V.I.: Metabolism in human thrombocytes. Biochemistry (USSR) 23, 379-389 (1958).

122 Lundin, P.M., Ridell, B., Weinfeld A.: The significance of bone marrow morphology for the diagnosis of polycythaemia vera. Scand. J. Haemat. 9, 271-282 (1972).

123 Madoff, M.A., Ebbe, S., Baldini, M.: Sialic acid of human platelets. J. Clin. Invest. 43, 87o-883 (1964).

124 Mac Pherson, G.G.: Changes in megacaryocyte development following thrombocytopenia. Brit. J. Haemat. 26, 1o5-115 (1974).

125 Maldonaldo, J.E., Pintado T., Pierre, R.V.: Dysplastic platelets and circulating megacaryocytes in chronic myeloproliferative diseases. I. The platelets: Ultrastructure and peroxidase reaction. Blood 43, 797-8o9 (1974).

126 Maldonaldo, J.E.: Dysplastic platelets and circulating megacaryocytes in chronic myeloproliferative diseases. II. Ultrastructure of circulating megacaryocytes. Blood 43, 811-82o (1974).

127 Maldonaldo, J.E.: The ultrastructure of the platelets in refractory anemia("Preleukemia") and myelomonocytic leukemia. Ser. Haemat. 8, 1o1-125 (1975).

128 Mañucci, P.M., Sharp, A.A.: Platelet volume and shape in relation to aggregation and adhesion. Brit. J. Haemat. 13, 6o4-613 (1967).

129 Mannucci, P.M. In: P.M.Mannucci and S. Gorini(eds): Platelet function and thrombosis. Adv. Exp. Med. Biol. 34, 57-78 (1972).

13o Marcus, A.J., Zucker, M.: Physiology of human platelets. New York-London: Grune and Stratton p.93-98 (1972).

131 Marcus, A.J., Zucker-Franklin, D., Safier, L.B., Ullmann, H.L.: Studies on human platelet granules and membranes. J. clin. Invest. 45, 14-29, (1966).

132 Marks, P.A., Johnson, A.R., Hirschberg, E., Banks, J.: Studies on the mechanisms of aging of human red blood cells. Am. N.Y. Acad. Sci.75, 95-116 &1958).

133 Mason, J.M.Jr., De Vita, V.T., Canellos, G.P.: Thrombocytosis in chronic granulocytic leukemia: Incidence and clinical significance. Blood 44, 483-487 (1974).

134 Mason, R.G., Read, M.S., Shermer, R.W.: Comparison of certain functions of human platelets separated from blood by various means. Am. J. Path. 76, 323-332 (1974).

135 Matter, M., Hartmann, J.R., Kautz, J., De Marsh, Q.B., Finch, C.A.: A studie of thrombopoiesis in induced acute thrombocytopenia. Blood 15, 174-183 (196o).

136 Mc Pride, J.A., Dacie, J.V., Shapley, R.: The effect of splenectomy on the leucocyte count. Brit. J. Haemat. 14, 225-231 (1968).

137 Mc Clure, P.D., Ingram, G.I.C., Stacey, R.S., Class, U.H. Matchett, M.O.: Platelet function test in thrombocythemia and thrombocytosis. B rit. J. Haemat. 12, 478-497 (1966).

138 Mc Donald, T.P., Odell, T.T. Jr., Goslee, D.G.: Platelet size in relation to platelet age. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 684-689 (1964).

139 Minter, F.M., Ingram, M.: Platelet volume: density relationships in normal and acutely bled dogs. Brit. J. Haemat. 2o, 55-68 (1971).

14o Morgan, M.C., Szafir, J.J.: Separation of platelets from whole blood by the use of silicone liquids. Blood 18, 89-94 (1961).

141 Moser, K., Lechner, K., Vinazzer, H.: A hitherto not described enzyme defect in thrombobasthenia: glutathionreductase-deficiency. Thrombos. Diathes. haemorrh. 19, 46-52 (1968).

142 Mourad, N.: A simple method for obtaining platelet concentrates free of aggregates. Transfusion 8, 48-49 (1968).

143 Murphy, S., Gardner, F.H.: Platelet preservation. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability . Deleterious effect of refrigerated storage. N. Engl. J. Med. 28o, 1o34-1o98 (1969).

144 Murphy, S., Oski, F.A., Naiman, J.L., Lusch, C.J., Goldberg, S., Gardner, F.H.: Platelet size and kinetics in hereditary and aquired thrombocytopenia. N.Engl. J. Med. 286, 499-5o4 (1972).

145 Mustard, J.F., Rowsell, H.C., Murphy, E.A.: Platelet economy (platelet survival and turnover). Brit. J. Haemat. 21, 1-17 (1966).

146 Nakeff, A., Ingram, M.: Platelet count: volume relationship in four mammalian species. J. Appl. Physiol. 28, 53o-533 (197o).

147 Neemeh, J.A., Bowie, E.J., Thomson, J.H., Didisheim, P., Owen, C.A.: Quantitation of platelet aggregation in MPD. Am. J. clin. Path. 57, 336-347 (1972).

148 Nerke, O., Benöhr, H.Chr., Thorau, U., Waller, H.D.: Enzymaktivitäten in normalen Thrombozyten verschiedener Dichte. Klin.Wschr. 55, 77-81 (1977).

149 Nerke, O., Benöhr, H.Chr., Thorau, U., Waller, H.D.: Enzymaktivitäten und Proteingehalt von Thrombozyten verschiedener Dichte bei Thrombozytosen unterschiedlicher Ätiologie. Klin.Wschr. 56, 43-47 (1978).

150 Nicholls, D.G., Hampton, J.R.: Density gradient separation of human platelets from plasma and the role of plasma in adenosine diphosphate induced platelet electrophoretic mobility changes. Thrombos. Diathes. haemorrh. 27, 425-433 (1974).

151 Nomura, T., Onozawa, Y.: Platelet aggregation in myeloproliferative disorders. Thrombos. Diathes. haemorrh. 27, 247-256 (1974).

152 Odell, T.T., Jackson, C.W., Friday, T.J., Charsha, D.E.: Effects of thrombocytopenia on megacaryocytopoiesis. Brit. J. Haemat. 17, 91-101 (1961).

153 Odell, T.T., Murphy, J.R., Jackson, C.W.: Stimulation of megacaryocytopoiesis by acute thrombocytopenia in rats. Blood 48, 765-776 (1976).

154 Olsson, J., Gardell, S.: Isolation and characterization of glycosaminoglycans from leukocytes and platelets. Biochim. Biophys. Acta. 141, 348-361 (1967).

155 Okuma, M., Steiner, M., Baldini, M.: Lipid peroxidation in aging platelets. Blood 34, 712-716 (1969).

156 Paulus, J.M.: Production et destruction des plaquettes sanguines. Paris, Masson, (1974).

157 Paulus, J.M., Breton-Gorius, J., Kinet-Denoël, C., Boniver, J.: Megacaryocyte ultrastructure and ploidy in human macrothrombocytosis. In: Platelets: production, function, transfusion and storage. (edits M.G. Baldini, S.Ebbe) New York, Grune and Stratton. p.131-141 (1974).

158 Paulus, J.M.: Platelet size in man. Blood 46, 321-336 (1975).

159 Pedersen, N.T.: The increase in the number of circulating megacaryocytes in blood platelets in rats after surgery. Scand. J. Haemat. 11, 71-77 (1973).

16o Penington, D.G., Olsen, T.E.: Megacaryocytes in states of altered platelet production: Cell numbers, size and DNA-content. Brit. J. Haemat, 18, 447-463 (197o).

161 Penington, D.G., Streatfield, K.: Heterogeneity of megacaryocytes and platelets. Ser. Haemat. 8, 22-48 (1975).

162 Penington, D.G., Lee, N.L.Y., Roxburgh, A.E., Mc Gready, J.R.: Platelet density and size: the interpretation of heterogeneity. Brit. J. Haemat. 34, 365-76 (1976).

163 Penny, T. Rozenberg, M.D., Firkin, B.G.: The splenic platelet pool. Blood 27, 1-16 (1966).

164 Pepper, H., Lindsay, S.: Responses of platelets, eosinophils and total leukocytes during and following surgical procedures. Surg. Gynec. Obstet. 11o, 319-326 (196o).

165 Petschow, D., Friedel, R., Trautschold, I.: Dichtegradienten. Zentrifugation menschlicher Blutplättchen. Enzymmuster und osmotische Resistenz einzelner Fraktionen. Blut 29, 297-3o8 (1974).

166 Remde, W., Patzelt, O., Werner, R.: Thrombozytose und Thrombozythämie- Symptom oder selbständiges Krankheitsbild? Blut 4, 1o2-112 (196o).

167 Rivard, G., Lazerson, J.: A simple method for platelet sizing. J. Lab. clin. Med. 86, 547-55o (1975).

168 Sahud, M.A.: Platelet size and number in alcoholic thrombocytopenia. N . Engl. J. Med. 17, 355-356 (1972).

169 Sanderson, J.H.: A method for concentrating platelets for direct studies of platelet aggregation in thrombocytopenia. Scand. J. Haemat. 11, 356-359 (1973).

17o Shulman, N.R., Watkins, S.P.Jr., Itscoitz, S.B., Students, A.B.: Evidence that the spleen retains the youngest and hemostatically most effective platelets. Trans. Assoc. Am. Physicians 81, 3o2-311 (1968).

171 Spaet, T.H., Lejnieks, I., Gayner, E.: Defective platelets in essential thrombocythemia. Arch. Intern. Med. 124, 135-141 (1969).

172 Sultan, Y., Jeanneau, C.: Myeloproliferative disorders and platelet aggregation. In: Caen, J. (ed): Platelet aggregation, Masson, Paris. p.193-211 (1971).

173 Schneider, W., Hübner, G., Scheurlen, P.G., Joist, J., Kübler, W., Lechler, E., Hellriegel, K.P., Gross, R.: Morphologische, biochemische und eiweißanalytische Untersuchungen bei einem Fall von Riesenplättchen-Thrombozytopathie mit Bence-Jones Proteinurie. Thrombos. Diathes. haemorrh. 25, 201-213 (1971).

174 Schulz, H.: Neue Aspekte zur Entstehung und Ultrastruktur des Thrombozyten. Hippokrates 39, 909-925 (1968).

175 Schulz, H., Pottel, A.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Megakaryozyten und Thrombozyten eines Falles von primärer hämorrhagischer Thrombozythämie. Blut 29, 208-222 (1969).

176 Stathakis, N., Papayannis, A., Arapakis, G., Oeconomopoulus, F., Gardikas, C.: Platelet function tests in myeloproliferative disorders. Proc. IV. Int. Congr. Thrombos. Haemost. Wien 135-146 (1973).

177 Strumia, M.M., Strumia, P.V., Bassert, D.: Splenectomy in leukemia. Cancer Res. 26, 529-540 (1966).

178 Steiner, M., Baldini, M.: Protein synthesis in aging blood platelets. Blood 33, 628-633 (1969).

179 Storm, O.: Postoperative Thrombozytosen. In: Thrombozytäre Gerinnungsstörungen. IX Hamburger Symposium, 223-225 (1966).

180 Straub, W.: Thrombozytose und Thrombozythämie. Schw. Med. Wschr. 8, 250-253 (1967).

181 Tangen, O., Berman, H.J., Marfey, P.: Gel filtration a new technique for separation of blood platelets from plasma. Thrombos. Diathes. haemorrh. 25, 268-278 (1971).

182 Tangen, O., Mc Kinnan, E.L., Berman, H.J.: On the fine structure and aggregation requirements of gel filtrated platelets. Scand. J. Haemat. 10, 96-105 (1973).

183 Tangün, Y.: Platelet aggregation and platelet factor -3-activity. Thrombos. Diathes. haemorrh. 25, 271-279 (1971).

184 Thiery, J.P., Bessis, M.: Mecanisme de la plaquettogenese. Étude in vitro par la microcine matographie. Rev. Hemat. 11, 162-17o (1956).

185 Tranum, B.L., Haut, A.: Thrombocytosis: platelet kinetics in neoplasia. J. Lab. Clin.Med. 84, 615-619 (1974).

186 Traynor, J.E.: Megacaryocyte and platelet production in normal dogs and dogs subjected to three types of marrow stress. Ph. D. thesis Univ. of Rochester N.Y. (1965).

187 Vainer, H.: Separation of platelet populations from human and rat blood. Methods and applications. Adv.Exp.Med.Biol. 34, 3o9-318 (1972).

188 Vogell, W., Bishay, F.R., Bücher, Th., Klingenberg, M., Zebe, E.: Über strukturelle und enzymatische Muster in Muskeln von Locusta migratoria. Z.Biochem. 332, 81-117 (1959).

189 Wallach, D.F.H., Kamat, V.B.: Plasma and cytoplasmatic fragments from Ehrlich's ascites carcinoma. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Washington, 52, 721-733 (1964).

19o Waller, H.D., Löhr, G.W., Grignani, F., Gross, R.: Über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher Plättchen. Thrombos. Diathes. haemorrh. 3, 32o-331 (1959).

191 Waller, H.D.: Der Kohlenhydratstoffwechsel normaler Thrombozyten. Klin.Wschr. 38, 1oo8-1o15 (196o).

192 Walsh, P.N.: Albumin density gradient separation and washing of platelets and the study of platelet coagulant activities. Brit. J. Haemat. 22, 2o5-217 (1972).

193 Ward, H.P., Block, M.H.: The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of its relationship with the myeloproliferative syndrome. Medicine 5o, 357-42o (1971).

194 Warren, R., Amdur, M., Belko, J.S., Baker, D.V.Jr.: Postoperative alteration in the coagulation mechanism of blood. Arch. Surg. 61, 419-432 (195o).

195 Weed, R.J., Crump, S.L., Swisher, S.N.: Evaluation of a technic for counting dog and human platelets. Blood 25, 261-266 (1965).

196 Weiner, M., Karpatkin, S.: Use of the megathrombocyte to demonstrate thrombopoietin. Thrombos. Diathes. haemorrh. 28, 24-35 (1972).

197 Weinfeld, A., Branehög, I., Kutti, J.: Platelets in the myeloproliferative syndrome. Clin. Haemat. 4, 373-392 (1972).

198 Weintraub, A.H., Karpatkin, S.: Heterogeneity of rabbit platelets II. Use of the megathrombocyte to demonstrate a thrombopoietic stimulus. J. Lab. Clin. Med. 83, 896-905 (1974).

199 Witte, S.: Megakaryozyten und Thrombocytopoese bei der experimentellen thrombocytopenischen Purpura. Acta Haemat. 14, 215-230 (1955).

200 Woodside, E.F., Kocholaty, W.: Carbohydrates of human and bovine platelets. Blood 16, 1173-1180 (1960).

201 Wright, J.H.: The histogenesis of blood platelets. J. Morph. 21, 263-278 (1910).

202 Zucker, M.A., Borelli, J.: Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold. Blood 9, 602-608 (1954).

203 Zucker, S., Mielke, C.H.: Classification of thrombocytosis based on platelet function tests: correlation with hemorrhagic and thrombotic complications. J. Lab. Clin. Med. 80, 385-394 (1972).

204 Zucker, W.H., Shermer, R.W., Mason , R.G.: Ultrastructural comparison of human platelets separated from blood by various means. Amer. J. Pathol. 77, 255-267 (1974).

Lebenslauf

Am 15.Oktober 1952 wurde ich, Ursula Margarete Thorau, geb.Maier, als Tochter der Helene Maier in Nagold/Calw geboren. Besuch der Volksschule und des Gymnasiums für Mädchen in Stuttgart-Feuerbach, dort Abitur im Juni 1971.

Beginn des Medizinstudiums in Tübingen im Wintersemester 1971/1972. Vorphysikum im Sommersemester 1972, Gesamtnote sehr gut. Physikum im Wintersemester 1973/74, Gesamtnote gut. Beide Prüfungen nach der alten Bestallungsordnung. Erstes Staatsexamen im Wintersemester 1974/75 nach der neuen Approbationsordnung.
Danach Beginn der experimentellen Arbeiten zur Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Chr. Benöhr.

Zweites Staatsexamen im Wintersemester 1976/77. Danach Internatsjahr am Universitätsklinikum Tübingen.

Drittes Staatsexamen am 25. April 1978 in Tübingen.

Während des Studiums Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes.
Seit 1. Februar 1979 am Zentralinstitut für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Tübingen als wissenschaftliche Angestellte beschäftigt.
Im Juni 1983 Facharztprüfung auf dem Gebiet "Anästhesiologie und Intensivmedizin".
Danach Wiederaufnahme der schriftlichen Abfassung der Dissertation. Einreichen der Arbeit beim Dekanat im August 1984.